



# تأثیر تزریق حاد متفورمین بر ذخیره حافظه موش $\alpha$ -های دیابتی مدل کوتاه مدت استرپتوزوسین در آزمون یادگیری احترازی مهاري

## Effects of acute injection of Metformin on memory retention of inhibitory avoidance learning in streptozotocin induced diabetic Rats



علوم پزشکی  
قزوین



منابع



اطلاعات  
تفضیلی



مجری و  
همکاران



صفحه نخست  
سامانه

چاپ  
صفحه

مجریان: محمد حسین اسماعیلی ، زهره روزبهانی

کلمات کلیدی: بیماری دیابت /بیماری آلزایمر /پروتئین های تایو فسفریله /پلاک های  
بتا آمیلوئیدی /متفورمین /ذخیره ی حافظه ی موش های دیابتی



### اطلاعات کلی طرح

کد طرح	۱۴۰۰۲۳۷۷
عنوان فارسی طرح	تأثیر تزریق حاد متفورمین بر ذخیره حافظه موش $\alpha$ -های دیابتی مدل کوتاه مدت استرپتوزوسین در آزمون یادگیری احترازی مهاري
عنوان لاتین طرح	Effects of acute injection of Metformin on memory retention of inhibitory avoidance learning in streptozotocin induced diabetic Rats
کلمات کلیدی	بیماری دیابت /بیماری آلزایمر /پروتئین های تایو فسفریله /پلاک های بتا آمیلوئیدی /متفورمین / ذخیره ی حافظه ی موش های دیابتی
نوع طرح	
نوع مطالعه	
مدت اجراء - روز	۳۶۵
ضرورت انجام تحقیق	تحقیق در مورد نقش عوامل دارویی همچون متفورمین که میتوانند مقاومت به انسولین نورونها را بهبود بخشند در درمان بیماری آلزایمر مورد توجه ویژه قرار گرفته است. چنین به نظر میرسد که داروی متفورمین از طریق کاهش مقاومت به انسولین در مغز بتواند در درمان آلزایمر موثر باشد. لذا، اثرات تزریق حاد درون صفاقی متفورمین با دوزهای مختلف بر ذخیره حافظه موشهای دیابتی شده با استرپتوزوسین در آزمون یادگیری احترازی غیرفعال مورد ارزیابی قرار میگیرد.
هدف کلی	تأثیر تزریق حاد متفورمین بر ذخیره حافظه موش $\alpha$ -های دیابتی مدل کوتاه مدت استرپتوزوسین

## در آزمون یادگیری احترازی مهاري

خلاصه روش کار تعداد ۹۰ سر موش نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم در ۷ گروه مورد آزمایش قرار میگیرند. موشها در شرایط استاندارد از نظر دما و نور نگهداری خواهند شد. برای القای دیابت تجربی ۵/۰ میلی لیتر از محلول استرپتوزوتوسین به صورت درون صفاقی تزریق میشود (۱ گروه کنترل؛ ۲) گروه سالی (۳) گروه دیابتی شده با استرپتوزوتوسین که خود به ۵ زیرگروه به شرح زیر تقسیم خواهند شد: (۱) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین؛ (۲) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین به همراه سالی؛ (۳) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین



## اطلاعات مجری و همکاران

نام و نام خانوادگی	سمت در طرح	نوع همکاری	درجه تحصیلی	پست الکترونیک
محمد حسین اسماعیلی	مجری اصلی/استاد راهنما اول	اجراء طرح		esmail۶@yahoo.com
محمد صوفی آبادی	استاد مشاور	استاد مشاور	دکترای تخصصی	mohasofi@yahoo.com
زهره روزبهانی	مجری اصلی/استاد راهنما اول		دکترای حرفه ای	drz.rzbhn@gmail.com



## اطلاعات تفصیلی

عنوان	متن
چکیده طرح	(۱) زمانی که طول خواهد کشید تا حیوان برای اولین بار وارد قسمت تاریک شود (۲) مدت کل زمانی که در قسمت روشن خواهد ماند (۳) مدت کل زمانی که در قسمت تاریک خواهد ماند در مدت ۹ دقیقه آزمون به خاطر آوری ثبت خواهد گردید. سپس، داده های جمع آوری شده از پارامترهای مذکور در هر یک از گروه های آزمایشی با استفاده از تست های آماری مناسب مورد مقایسه قرار خواهد گرفت [۱۹]. برای این منظور از روش آنالیز واریانس یکطرفه و پس آزمون های دانن یا توکی استفاده خواهد شد. p-Value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته خواهد شد.
پیشینه طرح	
فهرست کلی فصول	
هدف از اجرا	تاثیر تزریق حاد متفورمین بر ذخیره حافظه موش های دیابتی مدل کوتاه مدت استرپتوزوتوسین در آزمون یادگیری احترازی مهاري
فرضیات یا سوالات پژوهشی	۱- آیا تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین می تواند دیابت تجربی و اختلال حافظه ایجاد کند؟ ۲- آیا تزریق ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم متفورمین می تواند اختلال حافظه ناشی از تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین را کاهش دهد؟ ۳- آیا تزریق ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم متفورمین می تواند اختلال حافظه ناشی از تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین را کاهش دهد؟ ۴- آیا تزریق ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم متفورمین می تواند اختلال حافظه ناشی از تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین را کاهش دهد؟
چه موسساتی می توانند از نتایج طرح استفاده نمایند؟	
در صورت ساخت دستگاه نظر صنعت و	

کلید واژه های فارسی	بیماری دیابت/بیماری آلزایمر/پروتیین های تایو فسفریله/پلاک های بتا آمیلوئیدی/متفورمین/ذخیره ی حافظه ی موش های دیابتی
روش پژوهش و تکنیک های اجرایی	در این مطالعه که به روش تجربی انجام می گیرد در هر گروه از ۸-۱۰ سر موش که جمعا با محاسبه تلفات از ۹۰ سر موش سفید بزرگ نر بالغ نژاد Wistar (انستیتو پاستور ایران) استفاده می شود. تعداد ۹۰ سر موش نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم در ۷ گروه (حداقل ۱۰ موش در هر گروه) مورد آزمایش قرار خواهند گرفت. موش ها در شرایط استاندارد از نظر دما ( $23 \pm 2$ درجه سانتی گراد) و نور نگه داری خواهند شد. در طول مدت آزمایش موش ها آب و غذای طبیعی خود را آزادانه دریافت خواهند کرد. برای القای دیابت تجربی ۵/۰ میلی لیتر از محلول استرپتوزوتوسین (۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم، سیگمای آمریکا) به صورت درون صفاقی تزریق خواهد شد [۱۸]. گروه استرپتوزوتوسین در ۲۴ ساعت اول بعد از تزریق استرپتوزوتوسین برای جلوگیری از مرگ و میر ناشی از شوک هیپوگلیسمی به جای آب محلول گلوکز ۵ درصد دریافت خواهند کرد. برای تعیین میزان گلوکز خون ۴۸ ساعت بعد از تزریق استرپتوزوتوسین نمونه خون وریدی موش ها از ورید دمی آنها گرفته خواهد شد. فقط موش های دیابتی منظور خواهند شد که گلوکز خون آنها بیشتر از ۲۵۰ میلی گرم باشد. گروه ها مورد آزمایش به شرح زیر خواهند بود: (۱) گروه کنترل؛ (۲) گروه سالیین (۳) گروه دیابتی شده با استرپتوزوتوسین که خود به ۵ زیرگروه به شرح زیر تقسیم خواهند شد: (۱) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین؛ (۲) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین به همراه سالیین؛ (۳) گروه تحت تیمار با استرپتوزوتوسین به همراه متفورمین (سیگمای آمریکا) که متفورمین را با دوزهای (۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت درون صفاقی بلافاصله بعد از آموزش دریافت خواهند کرد [بر اساس رفرنس ۲۲ و ۱۶]. برای ارزیابی یادگیری و حافظه حیوان از دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال استفاده خواهد شد [بر اساس رفرنس ۱۹-۲۱].
دلایل ضرورت و توجیه انجام کار	تحقیق در مورد نقش عوامل دارویی همچون متفورمین که میتوانند مقاومت به انسولین نوروها را بهبود ببخشند در درمان بیماری آلزایمر مورد توجه ویژه قرار گرفته است. چنین به نظر میرسد که داروی متفورمین از طریق کاهش مقاومت به انسولین در مغز بتواند در درمان آلزایمر موثر باشد. لذا اثرات تزریق حاد درون صفاقی متفورمین با دوزهای مختلف بردخیره حافظه موشهای دیابتی شده با استرپتوزوتوسین در آزمون یادگیری احترازی غیرفعال مورد ارزیابی قرار میگیرد.
کلید واژه های فارسی بازنگری شده	
فهرست منابع و مراجع علمی داخلی	
فهرست منابع و مراجع علمی خارجی	
خلاصه نتیجه اجرای طرح	
سابقه علمی طرح و پژوهش های انجام شده با ذکر مأخذ به ویژه در ایران	
خلاصه طرح طبق اهداف پیش بینی شده	
WhatRequirementsAreMet	
ملاحظات گروه	
ملاحظات ناظر	
HomeAddress	
WorkPlace	

جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری

روش نمونه گیری انتخاب ۸ سر موش نر بطور تصادفی در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم برای هر گروه می باشد. حجم نمونه ها بر اساس ۵۹/۰ = P و با توجه به فرمول اماری و تحقیقات انجام شده در این زمینه مربوطه در نظر گرفته شده است. در این مطالعه برای بررسی اثر تزریق حاد متفورمین بر ذخیره حافظه موش های دیابتی مدل استرپتوزوسین از آزمون یادگیری احترازی مهارتی (inhibitory avoidance learning) (طب آزما - تبریز) استفاده خواهیم کرد. مراحل آزمون حافظه و یادگیری احترازی غیرفعال ۱- سازش یافتن: ابتدا همه گروه های آزمایشی به دستگاه عادت داده خواهند شد؛ به این ترتیب که موش های هر گروه یکی یکی درون دستگاه قرار خواهند گرفت و ۷ ثانیه بعد درب بین دو محفظه برداشته شده و به مدت دو دقیقه به موش اجازه داده خواهد شد آزادانه در دو محفظه تاریک و روشن رفت و آمد کند، که معمولاً در این مرحله موش به طور طبیعی تمایل خواهد داشت وارد محفظه تاریک شود. بلافاصله پس از ورود حیوان به قسمت تاریک، درب بسته خواهد شد و پس از سپری شدن چند ثانیه حیوان به قفس بازگردانده خواهد شد. ۲- اکتساب: ۳۰ دقیقه پس از عادت کردن، مرحله اکتساب انجام خواهد شد. بدین ترتیب که موش در قسمت روشن جعبه گذاشته خواهد شد و دودقیقه به حیوان مهلت داده خواهد شد تا وارد محفظه تاریک شود. بلافاصله بعد از ورود موش به قسمت تاریک درب بسته خواهد شد و شوک الکتریکی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۱ میلی-آمپر به مدت ۳ ثانیه به پای حیوان وارد خواهد گردید. سپس، موش از محفظه تاریک خارج شده و به قفس بازگردانده خواهد شد. پس از ۲ دقیقه موش مجدداً در ناحیه روشن قرار خواهد گرفت تا تست یادگیری انجام شود. عدم ورود به ناحیه تاریک به مدت ۱۲۰ ثانیه به عنوان یادگیری موفق در نظر گرفته خواهد شد. در صورت ورود مجدد حیوان به ناحیه تاریک، درب برای بار دوم بسته شده و شوک به صورت قبل وارد خواهد گردید و این کار آن قدر تکرار خواهد شد تا موش یاد بگیرد وارد محفظه تاریک نشود. (روند یادگیری به همین شکل است و معمولاً موش ها بعد از دوبار شوک دیدن یاد می گیرند که به قسمت تاریک وارد نشوند و نیاز به تکرار برای بار سوم نیست و معیار برای خروج وارد شدن به قسمت تاریک بعد از ۲ بار شوک دیدن می باشد) ۳- به خاطر آوری: در آزمون به خاطر آوری که ۴۸ ساعت بعد از آموزش صورت خواهد گرفت، موش در قسمت روشن قرار خواهد گرفت، ۷ ثانیه بعد درب باز خواهد گردید و ۱) زمانی که طول خواهد کشید تا حیوان برای اولین بار وارد قسمت تاریک شود و ۲) مدت کل زمانی که در قسمت روشن خواهد ماند ۳) مدت کل زمانی که در قسمت تاریک خواهد ماند در مدت ۹ دقیقه آزمون به خاطر آوری ثبت خواهد گردید. سپس، داده های جمع آوری شده از پارامترهای مذکور در هر یک از گروه های آزمایشی با استفاده از تست های آماری مناسب مورد مقایسه قرار خواهد گرفت [۱۹]. در تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون ANOVA یک طرفه و (آزمون تعقیبی توکی) استفاده خواهد شد.

بیان مسأله و بررسی متون

شواهد زیادی وجود دارد که نشان می دهد انسولین و سیگنالینگ انسولین برای بقاء نورون ها مهم می باشند [۲۰]. با مطالعه های انجام شده بر روی مغز بیماران آلزایمری کاهش بیان گیرنده انسولین در آنها نشان شده است [۲]. در حال حاضر این موضوع که بیماری آلزایمر با اختلال در سیگنالینگ انسولین و متابولیسم گلوکز در مغز مرتبط است به طور گسترده ای به رسمیت شناخته شده است و به همین دلیل پیشنهاد شده است که بیماری آلزایمر فرم خاصی از دیابت بوده و نام دیابت نوع ۳ را به آن داده اند [۳]. بالابودن انسولین خون (مشابه آنچه در دیابت تیپ ۲ اتفاق می افتد) یکی از ریسک فاکتورهای ابتلا به آلزایمر می باشد [۴]. نشانه های پاتولوژیک بیماری آلزایمر ظاهر شدن پروتئین های تائو فسفریله شده داخل سلولی و پلاک های بتا آمیلوئیدی خارج سلولی است

که به وسیله آنزیم های بتا و گاما سکرناز از پروتئین پیش ساز آمیلوئید به وجود می آیند [۵۶]. آمیلوئید بتا و پروتئین های تائو فسفریله شده باعث مسموم شدن موضعی نورون ها می شوند و در نهایت منجر به مرگ نورون ها و بروز بیماری آلزایمر می شوند. [۷]. مطالعات قبلی نشان داده است که دیابت خطر ابتلا به آلزایمر را افزایش می دهد [۸] بیان تائوهای فسفریله و آمیلوئید بتا در مغز موش های مبتلا به دیابت نوع ۱ و ۲ افزایش می یابد [۹-۱۱]. جالب اینکه یافته های اخیر نشان داده اند بتا آمیلوئید، می تواند حذف گیرنده های انسولین از غشاء نورون ها را تحریک کند و این امر منجر به ایجاد مقاومت بیشتر به انسولین در نورون ها می شود [۱۲]. به تازگی بیان شده است که القاء مقاومت به انسولین در مغز به وسیله تزریق داخل بطنی استرپتوزوسین کافی است تا تعدادی از جنبه های مهم بیماری آلزایمر را در حیوانات ایجاد کند و پیشنهاد شده است که این روش یکی از بهترین روش ها و مدل های ایجاد بیماری آلزایمر در حیوانات می باشد [۱۳]. متفورمین یکی از پر مصرف ترین کاهش دهنده های قند خون خوراکی است که به عنوان خط اول درمان بیماری دیابت نوع ۲ استفاده می شود [۱۴]. جالب اینکه گروهی از محققین نشان داده اند که متفورمین بیان آمیلوئید بتا در محیط های کشت نورونی را افزایش می دهد [۱۵]. این در حالی است که گروه دیگری از محققین نشان داده اند مغز موش های دیابتی نسبت به موش های طبیعی آمیلوئید بتای بیشتری داشته و هیپوکامپ موش های دیابتی نسبت به موش های گروه کنترل میزان پروتئین تائو فسفریله و غیرفسفریله و تام بیشتری دارد. به علاوه، تزریق درون صفاقی ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم متفورمین به موش ها ۱ دیابتی برای مدت ۱۸ هفته از افزایش میزان پروتئین تائو فسفریله و غیرفسفریله جلوگیری می کند [۱۶]. چنانچه نورون ها را در محیط کشت به مدت طولانی در معرض انسولین قرار دهند علاوه بر اینکه نسبت به انسولین مقاوم می شوند، نشانه های مولکولی و پاتولوژیکی بیماری آلزایمر را نیز از خود نشان می دهند و درمان با متفورمین از ظاهر شدن ویژگی های مولکولی و پاتولوژیکی مشاهده شده در بیماری آلزایمر در آنها جلوگیری می کند [۱۷]: تحقیقات متعددی نشان داده است که دیابت تیپ ۱ و ۲ به صورت پیشرونده ای باعث اختلال در یادگیری و حافظه می شود و تحقیقات قبلی ما نشان داد که تزریق درون صفاقی و داخل بطنی متفورمین می تواند به صورت وابسته به دوز یادگیری و حافظه موش های آلزایمری مدل استرپتوزوسین را بهبود بخشد [۲۲]. از این رو، تحقیق در مورد نقش عوامل دارویی هم چون متفورمین که می تواند مقاومت به انسولین نورون ها را بهبود ببخشند در درمان بیماری آلزایمر مورد توجه ویژه قرار گرفته است. با توجه به شواهد ارائه شده در بالا چنین به نظر می رسد که داروی متفورمین از طریق کاهش مقاومت به انسولین در مغز بتواند در درمان آلزایمر موثر باشد. لذا، در تحقیق پیش رو سعی خواهد شد اثرات تزریق حاد درون صفاقی متفورمین با دوز های مختلف بر ذخیره حافظه موش های دیابتی شده با استرپتوزوسین در آزمون یادگیری احترازی غیرفعال مورد ارزیابی قرار گیرد.



#### منابع

#### :References

Ryu BR, Ko HW, Jou I, Noh JS, Gwag BJ. Phosphatidylinositol 3- [1] kinasemediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I. J Neurobiol 1999; 39(4): 536-46

- de la Monte SM, Wands JR. Chronic gestational exposure to ethanol [2] impairs insulin-stimulated survival and mitochondrial function in cerebellar neurons. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(5): 882-93
- Hoyer S, Lannert H. Long-term abnormalities in brain glucose/energy [3] metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein. *J Neural Transm Suppl* 2007; (72): 195-202
- Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Hyperinsulinemia and [4] risk of Alzheimer disease. *Neurology* 2004; 63(7): 1187-92
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol [5] Rev* 2001; 81(2): 741-66
- Vassar R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. [6] *J Mol Neurosci* 2004; 23(1-2): 105-14
- Cherian B, Meka N, Katragadda S, Arora R. Therapeutic implications [7] of diabetes in cardiovascular disease. *Am J Ther* 2009; 16(6): e51-9
- Brands AM, Biessels GJ, de Haan EH, Kappelle LJ, Kessels RP. The [8] effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2005; 28(3): 726-35
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ. Impaired insulin and insulin-like growth [9] factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease: is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 2005; 7(1): 63-80
- Jolivalt CG, Lee CA, Beiswenger KK, Smith JL, Orlov M, Torrance [10] MA, et al. Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J Neurosci Res* 2008; 86(15): 3265-74
- Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL. Increased tau [11] phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology* 2009; 150(12): 5294-301
- Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon [12] MJ, et al. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J* 2009; 22(1): 246-60
- Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la [13] Monte SM. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006; 9(1): 13-33
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, [14] Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346(6): 393-403
- Chen Y, Zhou K, Wang R, Liu Y, Kwak YD, Ma T, et al. Antidiabetic [15] drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106(10): 3907-12
- Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z. Metformin attenuates Alzheimer's [16] disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 101(4): 564-74
- Gupta A, Bisht B, Dey CS. Peripheral insulin-sensitizer drug [17] metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes. *Neuropharmacology* 2011; 60(6): 910-20
- Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, Tawari S, Patil S, Dixit P, Umathe [18] S, Mundhada D. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Behav Brain Res*. 2011 Jun

. .20;220(1):30-41

Zarrindast MR, Bakhsha A, Rostami P, Shafaghi B. Effects of [19] intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. J Psychopharmacol 2002; 16(4): 313-].9

Nikzad S., Vafaei A.A.\* , Rashidy-Pour A. Assessment the effects of [20] Metirapone (as a glucocorticoids synthesis inhibitor) on memory retrieval and reconsolidation in rats. Pharmaceutical Sciences, 2010, Vol.16, No 3, .Page 139 -148

Paré WP. Enhanced retrieval of unpleasant memories influenced by [2] shock controllability, shock sequence, and rat strain. Biol Psychiatry. 1996 .May 1;39(9):808-13

Maryam Khosravi, Mohammad Hossein Esmaeili, Mahine Mafe [22] Esmaeili, The Effect of Metformin on spatial learning and memory in streptozotocin Rat Model of Alzheimer's Disease. Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, Volume 21, Number 4, .September & October 2014

de Senna PN, Xavier LL, Bagatini PB, Saur L, Galland F, Zanotto C, [23] Bernardi C, Nardin P, Gonçalves CA, Achava M. Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the blood brain barrier (in diabetic rats. Brain Res. 2015 May 29. pii: S0006-8993(15

---